

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

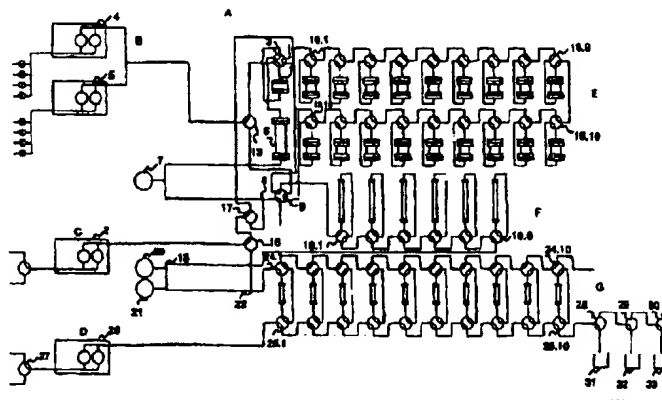
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01D 15/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/13118 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. April 1998 (02.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05093 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 41 210.2 25. September 1996 (25.09.96) DE 296 17 376.2 25. September 1996 (25.09.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AN-ALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE PHARMAZIE [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUMM, Holger [DE/DE]; Schönbaumer Weg 12, D-12503 Berlin (DE). MÜLLER-KUHRT, Lutz [DE/DE]; Wublitzweg 12a, D-14089 Berlin (DE). (74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig, Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: HPLC-BASED DEVICE AND METHOD FOR SEPARATING HIGH COMPLEX SUBSTANCE MIXTURES**(54) Bezeichnung:** VORRICHTUNG UND VERFAHREN AUF HPLC-BASIS ZUR TRENNUNG HOCHKOMPLEXER SUBSTANZGEMISCHE**(57) Abstract**

The invention concerns an HPLC-based device and method for separating high complex substance mixtures. Plant and microbial extracts are high complex substance mixtures. They contain large amounts of extremely polar and non-polar materials. In principle, said mixtures can be separated by using a chromatographic method. However, separation with existing chromatographic devices, for instance HPLC installations, is extremely time-consuming. The invention seeks to create a HPLC installation that separates fully automatically high complex substances in a very short time in such a way that said substances are broken down into their components in an almost pure state and can then be fed into a test system. To this end, said HPLC-based device comprises separation column units (A, F), fractionating column units (E, G), detector units (7, and 20, 21), pumping units (B, C, D) and fraction collecting units. These units, including all separating or fractionating columns, are interconnected and controlled by multiple way valves and by a computer unit that ensures the software-controlled operational interaction of the device.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtungen, z.B. HPLC-Anlagen, unvermeidbar hoch. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt, daß seine Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung auf HPLC-Basis, die Trennsäuleneinheiten (A, F), Fraktioniersäuleneinheiten (E, G), Detektoreinheiten (7 und 20, 21), Pumpeinheiten (B, C, D), Fraktionssammereinheiten umfaßt, wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzelnen Trenn- bzw. Fraktioniersäule über Mehr-Wege-Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind, sowie eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

Vorrichtung und Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische

10

Beschreibung

15 Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein
Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer
Substanzgemische.

20 Mehr als ein Drittel der zur Zeit am Markt befindlichen
Arzneimittel enthalten Wirkstoffe, die die Natur zur
Verfügung gestellt hat, d.h. sie wurden aus Pflanzen
oder Mikroorganismen isoliert, oder aber zumindest auf
dieser Basis modifiziert.

25 Trotz dieser relativ hohen Anzahl an biologisch aktiven
Substanzen, die die Natur zur Verfügung hat, hat man
sich weltweit bisher mehr auf die chemische Synthese
als auf den sogenannten Naturstoffpool konzentriert. In
den letzten Jahren wurden jedoch neue Wirkstoffe ent-
30 deckt, die von der Natur geschaffen wurden, und dadurch
erlebt die Naturstoffchemie bzw. Naturstoffbiotechnolo-
gie eine Renaissance.

35 Gleichzeitig mit der Entdeckung bzw. Herstellung neuer
Wirkstoffe erfolgte eine schnelle Entwicklung auf dem
Sektor der Testsystemkapazitäten. Während derartige

biologische Assays zur Auffindung neuer potentieller Wirkstoffe noch vor Jahren einige 100 mg Substanz erforderlich waren und damit häufig lediglich nur geringe Durchsätze von Tests pro Jahr möglich waren, stellt sich die Situation gegenwärtig grundlegend anders dar. Infolge von Testdesigns, die z.B. die Hemmung eines spezifischen Enzyms als Maß für die biologische Aktivität annehmen, lassen sich miniaturisierte Testautomaten realisieren, mit denen sich durchaus eine Million Substanzen pro Jahr bei gleichzeitig niedrigstem Substanzverbrauch untersuchen lassen. Das Vorhandensein dieser enormen Testsystemkapazitäten kommt der Naturstoffforschung entgegen, denn von den aus Pflanzen oder mikrobiellen Fermentationen isolierten reinen Naturstoffen stehen häufig nur wenige Milligramm zur Verfügung, solange eine besondere biologische Aktivität noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Obwohl bereits eine große Zahl von Naturstoffen bekannt sind, muß man davon ausgehen, daß die Natur noch eine viel größere Anzahl von Substanzen bereithält, die bisher unbekannt sind, so daß man an einem Hochdurchsatzscreening von einer großen Zahl pflanzlicher und mikrobieller Rohextrakte nicht vorbeikommt.

Die Prüfung natürlicher Extrakte erfordern allerdings eine langwierige Prozedur der Vorreinigung, Vortrennung, Zwischen- und Feinreinigung, die immer wieder unterbrochen werden müssen durch Testung auf biologische Aktivität. Diese Vorgehensweise erfordert einen hohen zeitlichen, personellen sowie logistischen Aufwand und führt darüberhinaus vielfach zu nicht weiter verfolgungswerten chemischen Substanzen.

In Anbetracht des Kostendruckes der aus dem Gesundheitswesen in die forschenden Einrichtungen hineingetragen wird, führen derartige Zeitverluste zu einer immer stärkeren Benachteiligung der auf der
5 Naturstoffforschung basierenden Forschung und Entwicklung. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit
10 chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtung, z.B. HPLC-Anlagen, unvertretbar hoch.

15 Im BEO-Jahresbericht '94 des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Seiten 413 und 414, ist eine HPLC-Anlage zur Naturstoffisolierung beschrieben, die pflanzliche und mikrobielle Extrakte grob- und feinfraktionieren soll.

20

Die Anlage weist folgende Nachteile auf:

- Die Zuschaltung hier genannter Fraktionssammelsäulen erfolgt über 12-Wege-Ventile, deren Einsatz bei präparativen Anwendungen sehr kostenaufwendig ist.
25 Die hier erforderliche Häufigkeit der Schaltungen führt zu einem schnelleren Verschleiß von Bauteilen und Dichtungen.
- Ein variabler Einsatz entsprechend der zu trennenden Gemische durch Erweiterungen oder auch Verringerung der Anzahl der Säulen ist nicht möglich, d.h., ein modularer Aufbau der Anlage ist aufgrund dieser
30 Konstruktion nicht durchführbar.
- Die große Anzahl von Fraktionssammelsäulen führt zu einer zu langen Laufzeit und zu einem hohen
35 Lösungsmittelverbrauch.

- Ein kostengünstiger und zeitsparender Roll-over-Betrieb ist nicht durchführbar.
- Die hier vorgesehene isokratische Trennung im zweiten Trennschritt führt ebenfalls zu einer nachteiligen
5 Verlängerung der Laufzeit.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt,
10 daß seine Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung und einem Verfahren auf HPLC-Basis gemäß der Ansprüche
15 1 und 22.

Die erfindungsgemäß zugrunde gelegte Technologie der Auftrennung der Extrakte ist die Hochdruckflüssig-Chromatographie, die in der Lage ist, sowohl relativ polare als auch unpolare Verbindungen zu trennen.
20 Aufgrund der hohen Anzahl von Substanzen in einem komplexen Substanzgemisch wie z.B. in pflanzlichen und mikrobiellen Extrakten, ist die Trennung in einem Schritt nicht möglich. Es ist vielmehr die erfindungsgemäße Kombination mehrerer
25 Trennsäulensysteme erforderlich, um in vertretbarer Zeit eine Auftrennung zu erreichen.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. So ermöglicht die Erfindung in einer Anlage eine Grob- und
30 eine Feintrennung vorzunehmen und zwischenzeitlich abgetrennte Fraktionen abrufbereit auf festen Phasen zu speichern, so daß innerhalb kürzester Zeit mittels der softwaregesteuerten Vorrichtung eine praktisch vollständige Auftrennung aller Substanzfraktionen
35 erreicht werden kann. Dadurch ist es denkbar, daß bei

günstiger Infrastruktur, also das Vorhandensein entsprechender Testsysteme verbunden mit einer Strukturaufklärung innerhalb von 2 bis 3 Tagen eine Identifizierung der wirksamen Komponente eines Extraktes zu ermöglichen. Das bedeutet eine extreme Beschleunigung des Wirkstofffindungsprozesses, der ausgehend von Naturstoffgemischen wie pflanzliche oder mikrobielle Extrakte üblicherweise Monate dauert. Vorteilhafterweise weist die erfindungsgemäße Vorrichtung einen modularen Aufbau auf, der Erweiterungen in Abhängigkeit von der Komplexität zu trennender Substanzgemische ermöglicht.

Die Erfindung wird anhand einer Zeichnung näher erläutert.

Es zeigt

Fig. 1 den Aufbau und Ablaufschema der Vorrichtung.

Das zu trennende Multikomponent-Gemisch (z.B. Pflanzenextrakt, mikrobieller Extrakt usw.) wird in Methanol gelöst und mit RP-4-Material (Korngröße ca. 40 μm) in folgendem Verhältnis 1 Massenteil Extrakt zu 3 Massenteilen RP-4-Material versetzt. Von diesem Gemisch wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so daß eine rieselfähige Mischung aus Extrakt und RP-Material entsteht. Die Mischung wird in eine Aufgabesäule 1 trocken verfüllt und in die Trennsäuleneinheit A eingebaut.

Mit einer Pumpe 2 und als Eluent Wasser wird über die 3-Wege-Ventile 16, 17 und über ein 6-Wege-Ventil 3 die Luft aus der trockenverfüllten Aufgabesäule 1 entfernt. Wenn die Luft entfernt ist, wird das Trennprogramm ge-

startet. Das Trennprogramm wird über eine Software gesteuert.

5 Mit einer Pumpe 4 und einer Pumpe 5 der Pumpeinheit B wird ein Gradient von 0% bis 100% des mit der Pumpe 5 geförderten Laufmittels bzw. Elemente mit einer Laufzeit von 60 min gefahren, wobei es sich bei Pumpe 4 um eine wäßrige Puffer-Lösung und bei Pumpe 5 um Methanol handelt. Die Komponenten des Extraktes werden in Abhängigkeit ihrer Polarität von der Aufgabesäule 1 über das 10 6-Wege-Ventil 3 auf die Trennsäule 6 gespült. Die Trennsäule 6 ist mit RP-4-Material gefüllt. In einem UV-Detektor 7 werden die Komponenten detektiert und mit der Software aufgezeichnet. Die Komponenten gelangen zu 15 einem T-Stück 8, wo über die Pumpe 2 und die 3-Wege-Ventile 16, 17 Wasser zum Eluent dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Danach gelangt dieses Eluat über ein 6-Wege-Ventil 9 zu einer Fraktionssäuleneinheit E, die aus 18 Fraktioniersäulen besteht. 20

Die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit E sind mit verschiedenen Sorbentien gefüllt, an denen durch Festphasenextraktion die Komponenten extrahiert werden. 25

Jede Fraktioniersäule wird für einen Zeitraum von 3 - 4 min geschaltet. Die Fraktioniersäulen werden über jeweilige 4-Wege-Ventile 18.1 bis 18.18 in den Eluentenstrom geschaltet. Dadurch wird der 60-minutige Gradient 30 in 18 Fraktionen aufgeteilt. Das komponentenfreie Eluat gelangt über das 6-Wege-Ventil 9 in den Abfall.

Jede einzelne der auf den 18 Fraktioniersäulen gespeicherten Fraktionen wird über eine der sechs Trennsäulen 35

einer Trennsäuleneinheit F weiter aufgetrennt. Dabei wird über die Pumpe 4 und Pumpe 5 der Pumpeinheit B, über das 3-Wege-Ventil 13, das 6-Wege-Ventil 9 und über das entsprechende 4-Wege-Ventil 18.1 bis 18.18 die Komponenten rückwärts von einer der Fraktioniersäulen auf eine der sechs Trennsäulen der Trennsäuleneinheit F gespült und die Komponenten weiter aufgetrennt. Die sechs Trennsäulen werden über entsprechende 4-Wege-Ventile 19.1 bis 19.6 geschaltet.

Die getrennten Komponenten gelangen nach der Trennsäuleneinheit F in ein Split-Ventil 15, wo ein Teil (ca. 1/40) des Volumenstromes einem Lichtstreuendetektor 20 zugeführt wird. Der restliche Volumenstrom gelangt über einen weiteren UV-Detektor zu einem T-Stück 22, wo über die Pumpe 2 und ein 3-Wege-Ventil 16 Wasser zum Eluat dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Dieses Eluat gelangt dann zu einer Fraktionssäuleneinheit G, die über zehn 4-Wege-Ventile 14.1 bis 14.10 geschaltet und mit den getrennten Komponenten beschichtet wird, dabei werden durch das Säulenmaterial die Komponenten aus dem Eluat extrahiert. Die Steuerung dieser Ventile erfolgt durch eine Kombination von Peakerkennung der Detektoren 20, 21 und durch Zeitsteuerung.

Die Ventile werden von dem Steuerungsprogramm so gesteuert, daß, wenn die erste Fraktioniersäule beladen ist, mit Hilfe einer Pumpe 26 einer Pumpeinheit D über ein 3-Wege-Ventil 27 Methanol über das entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 auf die erste Fraktioniersäule gefördert wird und die Komponenten über die 3-Wege-Ventile 28, 29, 30 in einen der Fraktionssammler 31, 32, 33 der Fraktionssammellereinheit H gespült werden. Die freigespülte Fraktioniersäule wird mit Wasser über das 3-Wege-Ventil 27 mittels Pumpe 26 und über das

entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 für die nächste Fraktionierung konditioniert.

- 5 Dadurch können mehr als 10 Fraktionen bearbeitet werden, weil gleichzeitig auf Fraktioniersäulen fraktioniert wird und auch Fraktioniersäulen gespült und konditioniert und damit für eine weitere Fraktionierung vorbereitet werden.

Vorrichtung und Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische

Bezugszeichenliste

1	Aufgabesäule	24	4-Wege-Ventil (24.1-24.10)
2	Pumpe (C)	25	4-Wege-Ventil (25.1-25.10)
3	6-Wege-Ventil	26	Pumpe (D)
4	Pumpe (B)	27	3-Wege-Ventil
5	Pumpe (B)	28	3-Wege-Ventil
6	Trennsäule	29	3-Wege-Ventil
7	UV-Detektor	30	3-Wege-Ventil
8	T-Stück	31	Fraktionssammler
9	6-Wege-Ventil	32	Fraktionssammler
13	3-Wege-Ventil	33	Fraktionssammler
15	Splitt-Ventil	A	Trennsäuleneinheit
16	3-Wege-Ventil	B	Pumpeinheit
17	3-Wege-Ventil	C	Pumpeinheit
18	4-Wege-Ventil (18.1-18.18)	D	Pumpeinheit
19	4-Wege-Ventil (19.1-19.6)	E	Fraktioniersäuleneinheit
20	Lichtstreuendetektor	F	Trennsäuleneinheit
21	UV-Detektor	G	Fraktioniersäuleneinheit
22	T-Stück	H	Fraktionssammlereinheit

Patentansprüche

1. Vorrichtung auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische, umfassend
5 - Trennsäuleneinheiten (A, F)
 - Fraktioniersäuleneinheiten (E, G)
 - Detektoreinheiten (7 und 20, 21)
 - Pumpeinheiten (B, C, D)
 - Fraktionssammereinheiten,
10 wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzel-
 nen Trenn- bzw. Fraktioniersäule über Mehr-Wege-
 Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind,
 und
 eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte
15 funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß sie mindestens zwei Trennsäuleneinheiten (A, F)
 aufweist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
25 dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens zwei
 Fraktioniereinheiten (E, G) aufweist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
30 dadurch gekennzeichnet,
 daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21)
 aufweist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D)
5 aufweist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die Trennsäuleneinheiten (A, F) und Fraktionier-
säuleneinheiten (E, G) alternierend angeordnet sind.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß eine Trennsäuleneinheit (A) eine in Reihe ge-
schaltete Aufgabesäule und eine Trennsäule enthält,
und die weiteren Trennsäuleneinheiten (F)
mindestens zwei Trennsäulen umfassen.
20
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäuleneinheit (A) aus einer Aufgaben-
25 schleife und einer Trennsäule besteht.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß mindestens zwei Detektoreinheiten (7, 20, 21)
enthalten sind, die zwischen Trennsäuleneinheiten (A,
F) und Fraktioniereinheiten (E, G) angeordnet sind.
- 35 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,

dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21)
aus einem selektiv und einem nicht selektiv messen-
den Detektor aufweist.

5

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Detektoren UV- und Lichtstreuendetektoren sind.

10

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen massenselektiven Detektor wie ein
Massenspektrometer aufweist.

15

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D) enthal-
ten sind, wobei mindestens eine Pumpeinheit (B)
mindestens zwei Hochdruckgradientenpumpen aufweist.

20

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Pumpeinheiten (B, C, D) über Mehr-Wege-Ven-
tile mit den Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) und
den Trennsäuleneinheiten (A, F) verbunden sind.

25

30

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheiten (A, F)
mit Reversed-Phase-Materialien (RP) gefüllt sind.

35

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (A, F)
5 und die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäulenein-
heiten (E, G) mit Normal- und Reversed-Phase-Mate-
rialien gefüllt sind.
- 10 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen und Fraktioniersäulen mit
Kieselgel, mit modifizierten Kieselgelen wie RP-2,
RP-4, RP-8, RP-18, Amino, Cyano, Phenyl, Diol,
15 Anionenaustauscher und Kationenaustauscher und/oder
mit Polymerphasen gefüllt sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die Pumpeinheit (B), die Trennsäuleneinheit (A)
und die Fraktioniersäuleneinheit (E) über ein 6-
Wege-Ventil (3) ansteuerbar miteinander verbunden
sind.
- 25 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trenn-
säuleneinheit (F) über ein 6-Wege-Ventil ansteuer-
30 bar miteinander verbunden sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
35 dadurch gekennzeichnet,

daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (F) je ein 4-Wege-Ventil aufweisen (18.1-18.18 und 19.1-19.6).

5

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (G) je zwei 4-Wege-Ventile (24.1-14.10 und 25.1-25.10) aufweisen.

10

22. Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische, umfassend die folgenden Stufen

15

- Gradiententrennung eines hochkomplexen Substanzgemisches in einer ersten Trennsäuleneinheit (A) in eine definierte Anzahl von Fraktionen mittels einer Pumpeinheit (B)

20

- Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)

- Überführung der Fraktionen in eine erste Fraktioniersäuleneinheit (G), deren Säulenanzahl der Anzahl der getrennten Fraktionen entspricht, und

25

Adsorption der vorher aufgetrennten Fraktionen auf je eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion

- sequenzielles Überspülen der in der ersten Fraktioniersäuleneinheit (E) adsorbierten Fraktionen mit weniger polaren Eluenten in eine zweite Trennsäuleneinheit (F) und weitere Auftrennung mit schwachem Gradienten mittels der Pumpeinheit (B)

30

- Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)
 - sequenzielle Überführung der weiter aufgetrennten Fraktionen entsprechend der Signale der Detektoreinheit (20, 21) in eine Fraktioniersäuleneinheit (G) und der Adsorption jeder Fraktion auf eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion
 - sequenzielles Überspülen der Fraktionen von der Fraktioniersäuleneinheit (G) in die Fraktionssamlereinheit (H) mittels einer Pumpeinheit (D) und eines weniger polaren Eluenten und anschließendem Konditionieren der freigespülten Fraktioniersäule mittels der Pumpeinheit (D),
wobei der Transport der mobilen Phase und die zwischenzeitlich erforderlichen Konditionierungs- bzw. Äquilibrationsschritte der einzelnen Säulen in den Trennsäuleneinheiten durch Steuerung der Pumpeinheiten (B, C, D), der Schaltung der Mehr-Wege-Ventile und der Fraktionssammler unter Verarbeitung der Signale der Detektoreinheiten (7 und 20, 21) über eine Rechneinheit erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Zugang der mobilen Phase zu jeder einzelnen Trennsäule der Trennsäuleneinheit (F) und zu jeder einzelnen Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) separat rechnergesteuert über 4-Wege-Ventile durchgeführt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23,
dadurch gekennzeichnet,

5 daß nach Freispülung einer Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheit (G) in einen Fraktions-
sammeler (31, 32, 33) der Fraktionssammelereinheit (H) mittels der Pumpeinheit (D) die Fraktionier-
säule mit Wasser für die nächste Fraktionierung
konditioniert wird (Roll-over-Betrieb).

10 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Zuführung des hochkomplexen Substanzgemisches zur Vorrichtung über eine Aufgabensäule erfolgt.

15 26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß das hochkomplexe Substanzgemisch mit einem Sorbent vermischt wird, in einem Lösungsmittel wie
20 Methanol suspendiert, danach das Lösungsmittel abgetrennt und der mit dem komplexen Substanzgemisch beladene Sorbent in die Aufgabensäule gefüllt wird.

25 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennung des Substanzgemisches in der Trennsäuleneinheit (A) mit einem Gradient erfolgt,
der eine zunehmende Lipophilie aufweist.

30 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Eluenten wäßrige Pufferlösungen und lipophilere Lösungsmittel eingesetzt werden.
35

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß als lipophilere Lösungsmittel Lösungsmittel wie
Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran und
5 Isopropanol eingesetzt werden.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein Peakerkennungsprogramm eingesetzt wird, das
es erlaubt die Anzahl der Fraktionen zu optimieren.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 30,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß in den Säulen der Fraktioniersäuleneinheit (E,
G) entsprechend der Polarität der Fraktion unter-
schiedliche Sorbentien eingesetzt werden.
- 20 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Freispülung der Fraktioniersäulen im Back-
flush-Verfahren erfolgt.

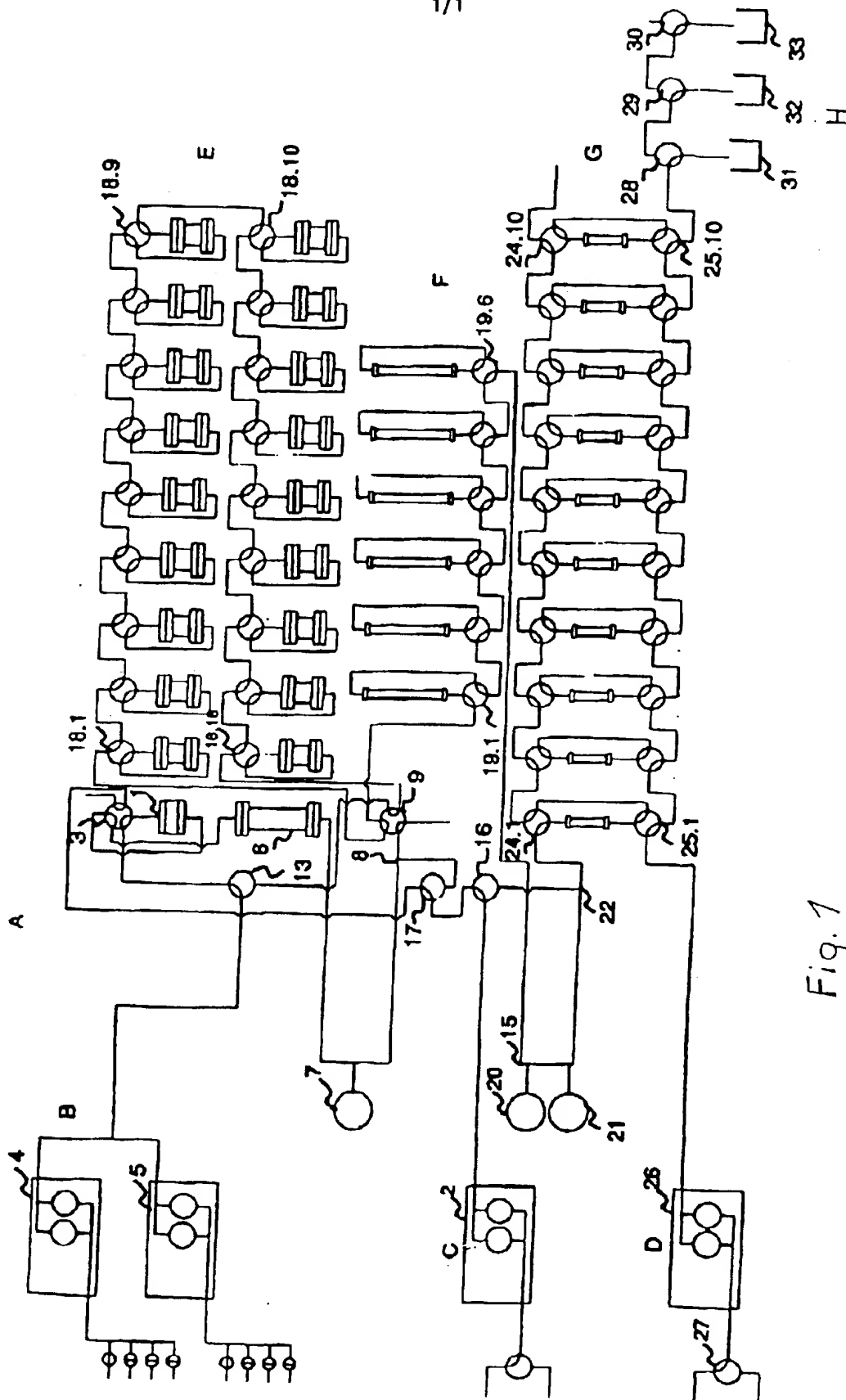


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/05093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 B01D15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 724 081 A (KAWAHARA) 9 February 1988 see column 4, line 35 - column 8, line 56 ---	1-17,22
A	DE 32 24 495 A (SCHÖNESHÖFER) 29 December 1983 see the whole document ---	1,22
A	US 4 806 250 A (TAKATA) 21 February 1989 see column 6; claims 1-6 ---	1
A	US 4 454 043 A (TING) 12 June 1984 ---	
A	US 5 443 734 A (FETNER) 22 August 1995 see column 14-16; claims 1-12 -----	22,25,26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 1998

Date of mailing of the international search report

19/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wendling, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05093

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4724081 A	09-02-88	NONE	
DE 3224495 A	29-12-83	EP 0103082 A	21-03-84
US 4806250 A	21-02-89	JP 62138753 A	22-06-87
US 4454043 A	12-06-84	NONE	
US 5443734 A	22-08-95	US 5512168 A	30-04-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05093

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 B01D15/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 724 081 A (KAWAHARA) 9. Februar 1988 siehe Spalte 4, Zeile 35 - Spalte 8, Zeile 56 ---	1-17,22
A	DE 32 24 495 A (SCHÖNESHÖFER) 29. Dezember 1983 siehe das ganze Dokument ---	1,22
A	US 4 806 250 A (TAKATA) 21. Februar 1989 siehe Spalte 6; Ansprüche 1-6 ---	1
A	US 4 454 043 A (TING) 12. Juni 1984 ---	
A	US 5 443 734 A (FETNER) 22. August 1995 siehe Spalte 14-16; Ansprüche 1-12 -----	22,25,26

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/01/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wendling, J-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05093

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4724081 A	09-02-88	KEINE	
DE 3224495 A	29-12-83	EP 0103082 A	21-03-84
US 4806250 A	21-02-89	JP 62138753 A	22-06-87
US 4454043 A	12-06-84	KEINE	
US 5443734 A	22-08-95	US 5512168 A	30-04-96